



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/81, 15/54, 9/10, C12P 19/02, 19/12, 19/28</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/10511</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. März 1999 (04.03.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/05309</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 20. August 1998 (20.08.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 197 36 343.1 21. August 1997 (21.08.97) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Postfach 1913, D-52425 Jülich (DE).</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: FROMMER, Wolf-Bernd [DE/DE]; Lammstrasse 9, D-72072 Tübingen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHRADER, Henning [DE/DE]; Broisterdstrasse 38, D-52382 Niederzier (DE). ELLING, Lothar [DE/DE]; Am Römerhof 18B, D-52066 Aachen (DE).</p> <p>(74) Anwalt: PIELKEN, Petra; Becker-Gundahl-Strasse 36, D-81479 München (DE).</p>		
<p>(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.</p>		

(54) Title: METHOD FOR INCREASING THE GENE EXPRESSION OF SACCHAROSE SYNTHASE

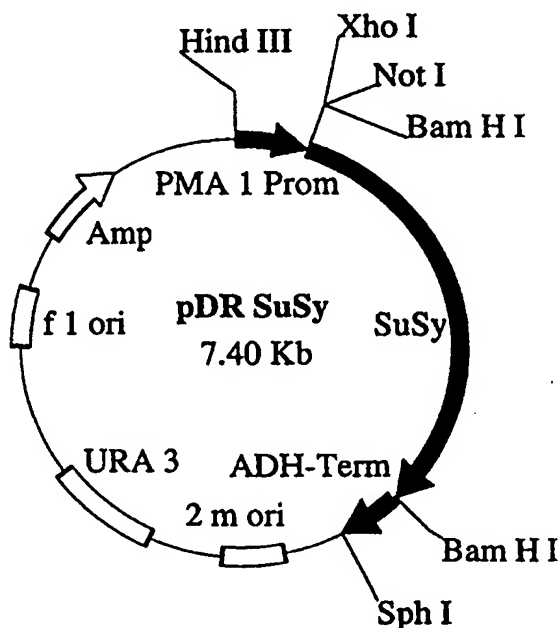
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ERHÖHUNG DER GENEXPRESSION VON SACCHAROSE SYNTHASE

(57) Abstract

The invention relates to a method for increasing the gene expression of saccharose synthase. To this end the invention provides for the expression of the saccharose synthase gene to be placed under the control of a proton-ATPase promoter. According to a preferred version of the invention gene expression of the saccharose synthase is also increased by increasing the number of copies of the saccharose synthase gene and of the proton-ATPase promoter.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erhöhung der Genexpression von Saccharose Synthase. Dafür wird erfindungsgemäß die Expression des Saccharose Synthasegens unter die Kontrolle eines Protonen-ATPase-Promotors gestellt. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Genexpression der Saccharose Synthase zusätzlich durch Erhöhen der Kopienzahl des Saccharose Synthasegens und des Protonen-ATPase-Promotors erhöht.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

5

Beschreibung

Verfahren zur Erhöhung der Genexpression von Saccharose Synthase

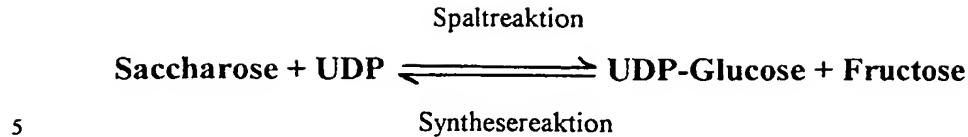
10

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erhöhung der Genexpression von Saccharose Synthase gemäß den Ansprüchen 1 bis 17, Saccharose Synthasegene gemäß den Ansprüchen 18 bis 21, Genstrukturen nach Anspruch 22, Vektoren nach Anspruch 23 und 24, transformierte Zellen nach Anspruch 25 bis 29 sowie Verwendungen einer Saccharose Synthase nach Anspruch 30.

Die Saccharose Synthase ist ein auf Pflanzen beschränktes Enzym. Von vielen höheren Pflanzen sind inzwischen je 2 unterschiedliche Gene pro Art bekannt; beim Reis kommen sogar 3 unterschiedliche Gene vor. In ihren biochemischen Eigenschaften nur wenig unterschiedlich, dienen sie mit unterschiedlichen Promotoren ausgestattet vor allem einer exakten Steuerung der Enzymexpression in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Organen der Pflanze. So kommt im Reis 8 Tage nach der Keimung die Saccharose Synthase 1 besonders in Wurzel und Stengel vor, während die Saccharose Synthase 2 in der gesamten Pflanze verteilt vorkommt. Saccharose Synthase 3 ist besonders in sich füllenden Reiskörnern aktiv, also in einer ganz anderen Lebensphase der Pflanze.

In der Pflanze dient das Enzym der Spaltung von Saccharose gemäß folgender Gleichung, wobei *in vivo* ausschließlich die Spaltreaktion Bedeutung hat:

30



Die Saccharose als Transportform der Kohlenhydrate in Pflanzen wird so in ihren Zielzellen, wie Zellen der Speicherorgane, Samen, sich entwickelnde Pflanzenorgane, in
10 die direkt weiter nutzbare UDP-Glucose und Fructose gespalten. Während die Fructose für weitere Nutzungen zunächst umgelagert werden muß, steht die UDP-Glucose direkt für die Synthese von Stärke und Cellulose zur Verfügung.

Von wirtschaftlichem und wissenschaftlichem Interesse sind sowohl Spalt- wie Syntheserichtung des Enzyms. In Syntheserichtung wird eine Vielzahl von räumlich ähnlich
15 aufgebauten Zuckern und Nichtzuckern akzeptiert. In Spaltrichtung werden Derivate der Saccharose akzeptiert, außerdem bevorzugt die Nucleosiddiphosphate (NDPs) UDP, ADP und TDP.

Somit wird eine große Zahl von saccharoseanalogen Disacchariden zugänglich. Diese
20 sind interessant zur Erforschung von Struktur und Funktion von Glykokonjugaten, wie Glykolipiden und Glykoproteinen. Da Glykokonjugate auch an der Kommunikation der Zellen untereinander beteiligt sind, haben viele dieser Strukturen auch eine Bedeutung in der medizinischen Forschung.

25 Gewinnbar ist das Enzym aus unterschiedlichen pflanzlichen Quellen. Für die Aufarbeitung beispielsweise aus Reissamen müssen die Samen zunächst gequollen werden; anschließend werden sie aufgeschlossen, die festen Bestandteile weitgehend

abfiltriert und das Filtrat an einer Ionenaustauschersäule vorgereinigt. Das nach dem Säulenschritt große Volumen wird eingeeengt und einer Gelfiltration unterworfen. Deren
5 aktive Fraktionen sind für Synthesen verwendbar (vgl. dazu auch DE 4 221 595).

Die beschriebene Gewinnung der Saccharose Synthase aus Reissamen ist insofern problematisch, als Reissamen nur eine geringe Aktivität von 0,56 Units pro Gramm Trockengewicht besitzen. Bei der Aufreinigung störend sind außerdem die reichlich
10 vorhandenen Kohlenhydrate in Form von Stärke und Cellulose. Weiterhin konnte das störende Enzym Invertase, das Saccharose spaltet, nicht vollständig abgetrennt werden. Eine Reduktion des außerdem störenden Enzyms Phosphatase, das NDPs zersetzt, und der Nucleotidzucker spaltenden Enzyme, die NDP-Zucker zersetzen, wäre sinnvoll. Darüber hinaus ist von Nachteil, daß die Saccharose Synthase im Reis offenbar nicht als
15 reines Enzym, sondern in wechselnden Verhältnissen von Isoenzymen vorliegt, die offensichtlich unterschiedliche Syntheseeigenschaften besitzen. Einige Synthesen von Disacchariden lassen sich deshalb mit unterschiedlichen Enzymchargen nur schwer reproduzieren. Da die Isoenzyme unterschiedlichen Reaktionskinetiken folgen, wurden Messungen der Kinetiken erschwert. Weiterhin lassen sich die Isoenzyme nicht
20 voneinander trennen, da sie einander sehr ähnlich sind. Schließlich ist die Aufreinigung auch sehr langwierig, da sich insbesondere auf die Gelfiltrationssäule nur kleine Fraktionen laden lassen. Eine Verkürzung der Reinigung wäre daher wünschenswert.

Zur Vermeidung der oben angeführten Nachteile ist die Schaffung eines rekombinanten
25 mikrobiellen Systems die Methode der Wahl. Um damit auch größere Mengen des Enzyms kostengünstig und umweltfreundlich produzieren zu können, sollten teure Zusatzstoffe oder Gifte im Anzuchtmedium vermieden werden. Ferner sollte nur ein einziges Saccharose Synthasegen zur Expression gelangen. Im Sinne einer beschleunigten Aufreinigung sollten Expressionen und / oder Aktivitäten von störenden Enzymen
30 möglichst gering sein.

Es wurde daher bereits der Versuch unternommen, ein Saccharose Synthasegen aus *Solanum tuberosum* (vgl. Salanoubat, M. und Belliard, G.: Molecular cloning and sequencing of sucrose synthase cDNA from potato (*Solanum tuberosum* L.): preliminary characterization of sucrose synthase mRNA distribution, in: *Gene* **60**, 47 - 56, 1987) in dem *Saccharomyces cerevisiae* - Stamm YSH zu exprimieren (vgl. Riesmeier, J.W. et al.: Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J.* **11** (13), 4705 - 4713, 1992). Dafür wurde das Gen unter der Kontrolle eines ADH-Promotors in das Plasmid 128A2 kloniert (vgl. Figur 1) und anschließend in den genannten Hefestamm transformiert. Der ADH-Promotor regelt normalerweise die Ablesehäufigkeit des Hefeenzym Alkoholdehydrogenase, das konstitutiv exprimiert wird und daher stets in ungefähr gleichen Mengen im Organismus vorhanden ist. Somit sollte also auch die Saccharose Synthase unter Kontrolle dieses Promotors ähnliche Expressionseigenschaften besitzen.

Die erzielte Expression verlieh dem Hefestamm zwar die Fähigkeit, Saccharose zu spalten. Jedoch war die spezifische Aktivität des Enzyms relativ gering: Je nach Bestimmungsmethode wurden 5 bis 25 mU Saccharose Synthase / mg Protein bestimmt.

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zur Erhöhung der Genexpression von Saccharose Synthase zu schaffen, durch das ein erhöhter Anteil an Enzym gebildet wird. Es ist ferner Aufgabe der Erfindung, Stoffe bereit zu stellen, die in einem solchen Verfahren einsetzbar sind.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren gelöst, bei dem die Expression des Saccharose Synthasegens unter die Kontrolle eines Protonen-ATPase-Promotors gestellt wird. Dafür wird der Protonen-ATPase-Promotor dem Saccharose Synthasegen insbesondere vorgeschaltet. Das Gen stammt vorzugsweise aus *Solanum tuberosum*, während der Protonen-ATPase-Promotor vorzugsweise aus Hefe, insbesondere aus *Saccharomyces cerevisiae* stammt.

Eine weitere Erhöhung der Genexpression wird erzielt, indem die Kopienzahl des
5 Saccharose Synthasegens und des Protonen-ATPase-Promotors erhöht wird. Dafür wird
das Gen mit dem Promotor in ein Genkonstrukt, vorzugsweise in das Plasmid pDR195
(vgl. Figur 2) eingebaut und das Genkonstrukt anschließend in einen Mikroorganismus,
insbesondere in den Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* 22574d (vgl. Jauniaux, J.-C.
et al., Nitrogen catabolite regulation of proline permease in *Saccharomyces cerevisiae*.
10 Cloning of the PUT4 gene and study of PUT4 RNA levels in wild-type and mutant
strains, Eur. J. Biochem. 164, 601 - 606, 1987) transformiert.

Das rekombinante Enzym wird vorzugsweise nach Aufschluß der Zellen zusätzlich
mittels Ionenaustausch und Ultrafiltration aufgereinigt. Da es für proteinchemische
15 Anwendungen oft notwendig ist, sehr reines Protein bereit zu stellen, erfolgt für die
weitere Reinigung der erwähnten technischen Enzympräparation daher insbesondere ein
weiterer Reinigungsgang an Chelating Sepharose.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältliche Saccharose Synthase ist für die
20 Spaltung von Disacchariden, wie beispielsweise 2-Desoxysaccharose oder N-Acetyl-
saccharosamin, mit UDP verwendbar. Ebenso ist das Enzym für die Spaltung von
Saccharose mit ADP verwendbar.

Das rekombinante Enzym ist generell genauso verwendbar wie das Enzym aus Reis (vgl.
25 Patentschrift DE 42 21 595)

Die Erfindung wird im folgenden anhand eines Ausführungsbeispiels näher erläutert.

Ausführungsbeispiel

5

1. Klonierung, Transformation und Expression der Saccharose Synthase aus *Solanum tuberosum* in *Saccharomyces cerevisiae* - Stamm 22574d.

10 Aus dem Plasmid 128A2SuSy (Figur 1) wurde das *susI*-Gen mittels des Restriktionsenzym *Bam*HI herausgeschnitten. Die Schnittprodukte wurden elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt, die *susI*-Sequenz herausgeschnitten und eluiert.

15 Der Vektor pDR195 (Figur 2) wurde ebenfalls mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI geschnitten. Dieser Ansatz wurde anschließend durch eine Phenolisierung gereinigt, mit Ethanol gefällt, wieder aufgenommen und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Die alkalische Phosphatase wurde innerhalb von 30 Minuten mit 50 mM EDTA bei 65°C deaktiviert. Es wurde erneut phenolisiert und anschließend mit Ethanol gefällt.

20 Mit ca. 200 µg Vektor und ca. 100 µg *susI*-Sequenz wurde über Nacht bei 16°C mit T4-Ligase ligiert. Die Ligationsprodukte wurden in kompetente *E. coli*-Zellen, Stamm DH5α, transformiert und auf diese Weise vereinzelt und auf Selektivmedium vermehrt. Diese *E. coli*-Kolonien wurden im 3 ml-Maßstab angezogen und eine Plasmidpräparation daraus durchgeführt. Die Plasmide wurden jeweils mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, 25 *Bam*HI+XhoI, HindIII geschnitten und die Schnittprodukte auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe der sich ergebenden Bandenmuster konnten diejenigen Plasmidkonstrukte identifiziert werden, die die Sequenz *susI* in der gewünschten Orientierung enthielten. Sie wurden als pDRSuSy bezeichnet (Figur 3). Ein zugehöriger *E. coli*-Stamm wurde ausgewählt und erneut im 3 ml-Maßstab angezogen, 30 um hinreichend Plasmid für die Transformation der Hefezellen gewinnen zu können.

Zur Transformation der Hefezellen wurden zunächst kompetente Hefen erstellt. Dazu wurde nach dem folgenden, allgemeinen Protokoll vorgegangen:

5

Es wurden folgende Lösungen hergestellt und sterilisiert (Sterilfiltration empfohlen; es kann aber auch 15 Minuten bei 121°C autoklaviert werden):

Lösung A:

- 10 10 mM BICINE pH 8,35 (eingestellt mit KOH)
1 M Sorbit
3 % Ethylenglycol

Lösung B:

- 15 200 mM BICINE pH 8,35
40 % PEG 1000

Lösung C:

- 10 mM BICINE pH 8,35
20 150 mM NaCl

Die Hefezellen wurden über Nacht bei 30°C und 200 Umdrehungen pro Minute in 5 ml YPD-Medium angezogen:

- 25 10 g Hefeextrakt
20 g Pepton
20 g Glucose auf 1 Liter dest. Wasser.

30

Diese 5 ml-Kulturen wurden vollständig überführt in 200 ml YPD, die auf 30°C angewärmt wurden. Bei dieser Temperatur und 120 Umdrehungen pro Minute erreicht
5 die Kultur nach ca. 3 Stunden eine OD₆₀₀ von 0,6. Die Kultur wurde 10 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute und 4°C abzentrifugiert und auf Eis mit 30 ml Lösung A gewaschen. Unter gleichen Bedingungen wurde erneut zentrifugiert und die Zellen in 2 ml Lösung A aufgenommen. Je 200 µl wurden in Reaktionsgefäße aliquotiert und im -70°C-Schrank eingefroren. Nach 60 Minuten sind sie weiter verwendbar und bleiben
10 dies einige Monate lang.

Für die Transformation wurden 1-2 µg des Plasmids mit 50 µg Heringssperma-DNA in 10 µl Wasser gemischt und diese Lösung zu einem Aliquot der eingefrorenen Zellen gegeben. Diese wurden bei 37°C für 5 Minuten unter Schütteln getaut. Anschließend
15 wurde 1 ml Lösung B zugegeben und der Ansatz unter vorsichtigem Schütteln bei 30°C 60 Minuten lang inkubiert. Danach wurden die Zellen für 2 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, das Pellet mit 500 µl Lösung C gewaschen, erneut zentrifugiert und in 100 µl Lösung C aufgenommen. Diese Suspension wurde auf SD-Festmedium mit 2 % Glucose ausplattiert.

20

Die so mit Plasmid pDRSuSy transformierten Hefen des Stammes 22574d wurden 2 Tage bei 30°C auf Platten wachsen gelassen. Die sich zeigenden Kolonien wurden auf SD-Medium weitervermehrt. Außerdem wurden diese Kolonien in flüssigem SD-Medium bis in die stationäre Phase angezogen (30°C, 120 Umdrehungen pro Minute
25 Schüttelgeschwindigkeit), die Zellen aufgeschlossen und der sich ergebende Extrakt im Vergleich mit dem Extrakt aus nicht transformierten Zellen auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Parallel wurde der Extrakt mit einem Enzymtest vermessen (Elling, L. und Kula, M.-R.: Purification of sucrose synthase from rice and its protein-chemical characterization, in: J. Biotechnol. 29, 277 - 286, 1993).

30

Das Polyacrylamidgel lieferte eine 90.000 kD Bande bei den transformierten Zellen, die bei den nicht transformierten fehlte. Eine Bande dieser Größe wurde für das Monomer
5 der Saccharose Synthase erwartet. Der Enzymtest lieferte eine eindeutige Aktivität des Extrakts der transformierten Zellen. Demgegenüber war die Aktivität der nichttransformierten Zellen unterhalb der Nachweisgrenze.

Da die Zellen das Gen konstitutiv exprimieren, muß kein besonderer Erntezeitpunkt
10 beachtet werden. Für den 10 l-Anzuchtmaßstab wird wie folgt vorgegangen: Von den monatlich neu auszustreichenden Erhaltungskulturen wird eine Kolonie ausgewählt und in ein Röhrchen mit 3 ml SD - 2 % Glucose überführt. Nach ca. 24 Stunden ist die Kultur ausgewachsen (alle Angaben beziehen sich auf 30°C Temperatur und 120 Umdrehungen pro Minute Schüttelgeschwindigkeit). Die Kultur wird in 50 ml des
15 gleichen Mediums überführt und erneut 24 Stunden inkubiert. Anschließend wird die 50 ml-Kultur in 250 ml überführt und wiederum 24 Stunden geschüttelt. Mit den 250 ml impft man schließlich 5 mal 2 l SD - 2 % Glucose an und läßt die Kulturen zu Ende wachsen (über Nacht zu einer OD₆₀₀ von ca. 3,5 bis 4,0).

20 Die Zellen werden per Zentrifugation geerntet, in 200 mM HEPES pH 7,6 im Verhältnis 4:6 (w/w) aufgenommen und können dann direkt aufgeschlossen oder einige Monate bei -20°C gelagert werden.

2. Aufreinigung der rekombinanten Saccharose Synthase

25 Die in 200 mM HEPES pH 7,6 aufgenommenen Zellen wurden in einer Glasperlenmühle 20 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute Rührgeschwindigkeit zermahlen. Die verwendeten Glasperlen hatten einen Durchmesser von 0,5 mm. Während und nach dem Mahlvorgang wurde die Suspension auf Eis gehalten. Abschließend wurden die festen
30 Bestandteile durch eine Zentrifugation bei 15000 Umdrehungen pro Minute und 4°C über 15 Minuten abgetrennt.

Die Saccharose Synthase wurde anschließend mittels Anionenaustauschchromatographie
5 aufgereinigt. Die Chromatographieranlage bestand aus einer Säule mit 300 ml Q-
Sephrose FF, einer P1-Pumpe, einem Detektor UV-1 (280 nm), einem
Fraktionssammler Frac 300 sowie einem Schreiber REC 101. Alle Materialien stammten
von Pharmacia.

10 Die Säule wurde mit 1 Liter 50 mM HEPES-NaOH pH 8,0 (Standardpuffer) bei einer
Flußrate von 10 ml pro Minute äquilibriert. Die Flußgeschwindigkeit blieb für alle
weiteren Schritte konstant.

Anschließend erfolgte die Ladung von Zentrifugationsüberstand, wobei Material aus bis
15 zu 5 Litern Kultur aufgegeben werden kann. Nicht gebundene Proteine wurden mit 1
Liter Standardpuffer mit 0,1 M KCl ausgewaschen.

Der Salzgradient wurde mit Puffer A (Standardpuffer mit 0,1 M KCl) und Puffer B
(Standardpuffer mit 0,4 M KCl) gestartet. Das Gesamtvolumen des Gradienten betrug 1
20 Liter, kann aber auch auf 1,5 Liter gestreckt werden. Im Bereich zwischen 0,2 und 0,3 M
KCl eluiert die Saccharose Synthase.

Mit dem folgenden Spülschema wurde die Säule regeneriert: 500 ml 0,1 M Kaliumacetat
pH 4,0 mit 1 M NaCl; 1 Liter Wasser; 300 ml 2 M NaOH; 1 Liter Wasser; 500 ml 50
25 mM HEPES pH7,6 mit 1 M NaCl; 1 Liter Wasser.

Zur Lagerung bei 4°C wurde das Gel in 20 % Ethanol eingelegt.

Die Saccharose Synthase enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und sukzessive an
30 einer 50 ml Ultrafiltrationszelle der Firma Amicon eingeengt. Als Membran diente eine
Amicon YM30 (Ausschlußgröße 30000d), Durchmesser 43 mm.

Pro Lauf einer 300 ml Q-Sepharose FF-Säule kann auf 5 bis 10 ml eingeeengt werden.

5

Die erhaltene Präparation ist für Synthesen verwendbar.

Für Untersuchungen des Proteins selbst wurde anschließend die rekombinante Saccharose Synthase einer weiteren Reinigung an Chelating Sepharose unterworfen.

10 Dafür wurde das Gelmaterial „Chelating Sepharose Fast Flow“ von Pharmacia verwendet.

Die mit 50 ml Gelmaterial gepackte Säule wurde mit 3 Volumen 1 M NaCl in 0,1 M Natriumacetat pH 4,0 äquilibriert. Anschließend wurden im gleichen Puffer 0,1 M CuSO₄ gelöst und so lange über die Säule gespült, bis die Säule gleichmäßig blau gefärbt war. Überschüssiges Kupfersulfat wurde mit 3 Säulenvolumen 1 M NaCl in 0,1 M Natriumacetat pH 4,0 heruntergespült.

15 Vor Probenaufgabe wurde die Säule wie folgt äquilibriert: Es wurde zunächst mit 150 mM KCl in 200 mM HEPES pH 7,2, anschließend mit je 3 Säulenvolumen dieses Puffers und 10 mM Imidazol und schließlich mit diesem Puffer und 1 mM Imidazol gespült.

Die Probe bzw. Proteinlösung wurde zunächst auf eine Konzentration von 1 mM Imidazol gebracht und anschließend über die Säule gepumpt. Ungebundene Proteine wurden von der Säule mit 1 mM Imidazol in 150 mM KCl und 200 mM HEPES pH 7,2 gewaschen. Die allmähliche Elution der gebundenen Proteine erfolgte über einen Imidazolgradienten von 1 mM bis 70 mM in 150 mM KCl und 200 mM HEPES pH 7,2. Dabei erscheinen die meisten Proteine bei 20 bis 30 mM Imidazol, während die Saccharose Synthase bei 30 bis 55 mM erscheint.

30

Mit Hilfe eines anschließenden Waschschrilles mit 100 mM Imidazol in 150 mM KCl und 200 mM HEPES pH 7,2 wurde die Säule in den Zustand der erneuten Benutzbarkeit
5 gebracht. Ist eine weitere Nutzung nicht gewünscht, wird das Kupfer mit 3 Säulen-
volumen 10 mM EDTA in 150 mM KCl und 200 mM HEPES pH 7,2 herunter-
gewaschen. Zur vollständigen Reinigung erfolgt eine weitere Waschung mit 3 Säulen-
volumen 50 mM EDTA in Wasser. Damit ist das Material wieder in seinem Ausgangszu-
stand. Es wird in 20 % Ethanol bei 4°C gelagert.

10

Mit Hilfe dieses Reinigungsganges gelang die Weiterreinigung einer Präparation von 2,4
U Saccharose Synthase / mg Protein auf 6,4 U / mg Protein bei einer Ausbeute von 82
%. Das entspricht einem Reinigungsfaktor von 2,7. Insgesamt konnten im Eluat 96 %
der eingesetzten Aktivität wiedergefunden werden.

15

Tabelle 1 zeigt einen Vergleich der Reinigungsschemen von Hefe und Reis. Die
folgenden Schritte der Ionenaustauschchromatographie und Ultrafiltration erfolgen bei
Hefe und Reis identisch: die Chromatographie an Q-Sepharose FF, die Ultrafiltration an
Membranen mit einem cut-off von 30000 Da. Die Reispräparation muß anschließend
20 noch auf einer Gelfiltrationssäule feingereinigt werden, um noch vorhandene Invertase
abzutrennen, was allerdings nicht vollständig gelingt. Dies führt bei der Applikation der
Saccharose Synthase in Synthesen zu unerwünschten Abbaureaktionen der Produkte.
Demgegenüber enthält Hefe keine Invertase, wenn man sie auf saccharosefreiem Medium
anzieht. Eine Feinreinigung per Gelfiltration ist daher nicht notwendig. Dies spart
25 Material, beschleunigt den Reinigungsprozeß und erhöht die Ausbeute an Enzym, stellt
also einen ökonomischen Vorteil dar.

30

- Tabelle 2 zeigt einen Vergleich zweier Aufarbeitungen aus Hefe und Reis nach dem Reinigungsschema von Tabelle 1: Die in der Biomasse vorhandenen Aktivität ist in der Hefe um den Faktor 10 höher als im Reis. Entsprechend höher ist auch die spezifische Aktivität des Enzyms im Rohaufschluß. Da die in den folgenden Aufarbeitungsschritten benutzten Säulen in ihrer Beladungskapazität durch die Menge an aufgegebenem Protein begrenzt sind, kann daher pro Säulenlauf eine größere Menge Enzym gereinigt werden.
- 10 Nach Ionenaustauscher und Ultrafiltration ist das rekombinante Enzym aus Hefe sauberer als das Enzym aus Reis. Wichtiger ist jedoch, daß die Präparation des rekombinanten Enzyms keine relevanten Mengen an Nebenaktivitäten mehr enthält. Für das Enzym aus Hefe ist die Reinigung damit bei einer Gesamtausbeute von 40% abgeschlossen. Demgegenüber muß die Reispräparation noch einem Gelfiltrationsschritt
- 15 unterworfen werden, der die Sauberkeit um den Faktor 10 erhöht, aber die Nebenaktivitäten nur ungenügend abtrennen kann. Statt dessen sinkt die Ausbeute der Gesamtreinigung auf 11,3%.

- Tabelle 3 vergleicht die Nebenaktivitäten in den beschriebenen Enzympräparationen aus Hefe und Reis. Wie in Tabelle 1 dargestellt, umfaßt die Reinigung des rekombinanten Enzyms aus Hefe 4 Schritte, während die Reinigung aus Reis 5 Schritte umfaßt. In beiden Fällen können die NDP abbauenden Phosphatasen komplett entfernt werden. Die in der Hefe aufgrund der Kulturbedingungen nicht vorhandene Invertase ist in der Präparation aus Reis noch in solchen Mengen vorhanden, daß einige langsame Synthesereaktionen stark gestört werden, da die Invertase das Syntheseprodukt sogleich wieder spaltet. UDP-Glucose abbauende Aktivitäten treten in der Präparation aus Hefe in viel geringerem Maße auf.

3. Saccharose Spaltung mit der rekombinanten Saccharose Synthase

- 5 Es wurde zunächst die Akzeptanz der rekombinanten Saccharose Synthase für unterschiedliche NDPs zur Saccharose Spaltung untersucht. Die Reaktionsbedingungen für diese Untersuchung waren wie folgt:

	NDP-Konzentration:	1,6 mM
10	Saccharose:	500 mM
	Saccharose Synthase:	0,035 U
	Puffer (HEPES-KOH, pH 7,6):	200 mM
	Volumen:	1 ml

- 15 Die Reaktionen mit den unterschiedlichen NDPs wurden bei einer Temperatur von 30°C durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in Figur 4 dargestellt. Als Akzeptanz von NDPs zur Saccharose Spaltung in Abhängigkeit von der Reaktionszeit ergibt sich die folgende Reihe:

- 20
$$\text{UDP} > \text{ADP} = \text{TDP} > \text{CDP} > \text{GDP}$$

- Desweiteren wurde mit der rekombinanten Saccharose Synthase die Michaelis-Menten-Kinetik der Saccharose Spaltung mit UDP in Abhängigkeit zur Saccharosekonzentration
25 bestimmt. Die Reaktionsbedingungen dafür waren wie folgt:

	UDP-Konzentration:	1,6 mM
	Saccharose Synthase:	14 mU
	Puffer (HEPES-KOH, pH 7,6):	200 mM
30	Volumen:	1 ml

Die Reaktionen wurden bei einer Temperatur von 30°C durchgeführt; die Reaktionszeit betrug jeweils 10 Minuten.

5

In Figur 5 ist die Michaelis-Menten-Kinetik der Saccharose Spaltung in Abhängigkeit zur Saccharosekonzentration dargestellt. Die Auftragung zeigt einen K_m für Saccharose von 66 mM. Bei Konzentrationen von mehr als 600 mM Saccharose kommt es zu einer Substratüberschußhemmung.

10

4. Synthese ausgewählter Nucleotidzucker mit der rekombinanten Saccharose Synthase

Die im folgenden beschriebenen Synthesen von ADP-Glucose, UDP-2-Desoxyglucose und UDP-N-Acetylglucosamin folgen der Spalttrichtung des Enzyms mit ADP bzw. UDP.

4.1 Synthese von ADP-Glucose

20 Für die Synthese von ADP-Glucose wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

	AMP:	4 mM
	ATP:	4 mM
	Rekombinante Saccharose	
25	Synthase:	100 U
	Myokinase aus	
	Kaninchenmuskel:	10 U
	BSA:	100 mg
	MgCl ₂ :	0,125
30	Puffer A:	100 ml

Puffer A: HEPES-NaOH, pH 7,5: 200 mM
 Saccharose: 500 mM
5 DTT: 3 mM

Der Reaktionsansatz wurde sterilfiltriert und anschließend über Nacht bei 30°C gerührt.
Am nächsten Tag wurde die Reaktionslösung in einer Amiconzelle Typ 8050 mit einer
YM 10-Membran (cut-off von 10.000 d) auf 10 ml eingengt. Dadurch blieben die
10 Proteine im Ansatz, während die Reaktionsprodukte abgezogen wurden.

Mit 90 ml der folgenden Substratlösung:

AMP: 4 mM
15 ATP: 4 mM
MgCl₂: 0,125 mM
in Puffer A, sterilfiltriert,

wurde der Ansatz aufgefüllt und eine erneute Reaktion über Nacht durchgeführt. Diese
20 wurde insgesamt 10 mal wiederholt. Im Verlauf der Reaktionswiederholung wurden 10
U Myokinase nachdosiert.

Auf diese Weise waren 2,8 g ADP-Glucose mit einer Ausbeute von 55% in Bezug auf
die eingesetzten AMP und ATP herstellbar. Die Gesamtausbeute der Synthese nach
25 erfolgter Reinigung betrug 2,2 g entsprechend 43,6%.

4.2 Synthese von UDP-2-Desoxyglucose und UDP-N-Acetylglucosamin

Für die Synthese von UDP-2-Desoxyglucose und UDP-N-Acetylglucosamin wurde
30 folgender Reaktionsansatz verwendet:

	Disaccharid:	250 mM
	UDP:	2 mM
5	Saccharose Synthase:	in unterschiedlichen Mengen
	HEPES-NaOH, pH 7,6:	200 mM
	Volumen:	1 ml

Die Reaktionsansätze wurden 24 Stunden bei 30°C inkubiert und die Reaktionen
10 anschließend bei 95°C über 5 Minuten gestoppt.

Auf diese Weise waren mit 0,11 U Saccharose Synthase 5,9% der 2-Desoxysaccharose
spaltbar. Mit 1,25 U des Enzyms konnten 12,4% des N-Acetylsaccharosamins umgesetzt
werden.

Tabelle 1: Vergleich der Reinigungsschemen von Hefe und Reis

Hefe	Reis
Aufschluß	Aufschluß
Zentrifugation	Filtration
Ionenaustausch	Ionenaustausch
Ultrafiltration	Ultrafiltration
/	Gelfiltration

Tabelle 2: Vergleich der Aufarbeitungsdaten von Hefe und Reis

	Hefe	Reis
Aktivität pro Gramm Zellen bzw. Reissamen	6,2U/g	0,56U/g
spezifische Aktivität im Rohaufschluß	0,22U/mg Protein	0,07U/mg Protein
spezifische Aktivität nach Ionentauscher und Ultrafiltration	2,4U/mg Protein	1,4U/mg Protein
spezifische Aktivität zu Reinigungsabschluß	2,4U/mg Protein	13,6U/mg Protein
Ausbeute Gesamtreinigung	40%	11,3%

Tabelle 3: Vergleich der Nebenaktivitäten

Nebenaktivitäten	Hefe aus 4 Schritten	Reis aus 5 Schritten
Phosphatasen	0	0
Invertase	0	0,05%
UDPGlucose Abbau	0,0018%	0,05%

Forschungszentrum Jülich GmbH

5 P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Erhöhung der Genexpression von Saccharose Synthase, bei
dem die Expression des Saccharose Synthasegens unter die Kontrolle eines
10 Protonen-ATPase-Promotors gestellt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß dem Saccharose Synthasegen der Protonen-ATPase-Promotor
15 vorgeschaltet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Saccharose Synthasegen aus *Solanum tuberosum* stammt.
20
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Protonen-ATPase-Promotor aus Hefe stammt.
- 25 5. Verfahren nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Protonen-ATPase-Promotor aus *Saccharomyces cerevisiae* stammt.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß die Genexpression der Saccharose Synthase zusätzlich durch Erhöhen
der Kopienzahl des Saccharose Synthasegens und des Protonen-ATPase-
Promotors erhöht wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6,
10 dadurch gekennzeichnet,
daß zur Erhöhung der Genkopienzahl das Gen und der Promotor in ein
Genkonstrukt eingebaut wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7,
15 dadurch gekennzeichnet,
daß das Gen und der Promotor in das Plasmid pDR195 eingebaut wird.
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß ein Mikroorganismus mit dem das Saccharose Synthasegen und den
Protonen-ATPase-Promotor enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß Hefe mit dem Genkonstrukt transformiert wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß *Saccharomyces cerevisiae* mit dem Genkonstrukt transformiert wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß der Stamm 22574d mit dem Genkonstrukt transformiert wird.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
10 daß die Saccharose Synthase zusätzlich aufgereinigt wird.
14. Verfahren nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein Reinigungsschritt eine Ionenaustauschchromatographie umfaßt.
15. Verfahren nach Anspruch 14,
gekennzeichnet durch
Anionenaustauschchromatographie.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 15,
20 dadurch gekennzeichnet,
daß ein Reinigungsschritt eine Ultrafiltration umfaßt.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß zur Feinreinigung des Enzyms ein Reinigungsgang an Chelating
Sepharose erfolgt.
18. Saccharose Synthasegen mit vorgeschaltetem Protonen-ATPase-Promotor.

19. Saccharose Synthasegen nach Anspruch 18,
gekennzeichnet durch
5 das Saccharose Synthasegen aus *Solanum tuberosum*.
20. Saccharose Synthasegen nach Anspruch 18 oder 19,
gekennzeichnet durch
den Protonen-ATPase-Promotor aus Hefe.
10
21. Saccharose Synthasegen nach Anspruch 20,
gekennzeichnet durch
den Protonen-ATPase-Promotor aus *Saccharomyces cerevisiae*.
- 15 22. Genstruktur, enthaltend ein Saccharose Synthasegen nach einem der
Ansprüche 18 bis 21.
23. Vektor, enthaltend ein Saccharose Synthasegen nach einem der Ansprüche
18 bis 21 oder eine Genstruktur nach Anspruch 22.
20
24. Vektor nach Anspruch 23,
gekennzeichnet durch
Plasmid pDR195.
- 25 25. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form ein Saccharose
Synthasegen nach einem der Ansprüche 18 bis 21.
26. Transformierte Zelle nach Anspruch 25, enthaltend eine Genstruktur nach
Anspruch 22 oder einen Vektor nach Anspruch 23 oder 24.

27. Transformierte Zelle nach Anspruch 25 oder 26,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß sie eine Hefezelle ist.
28. Transformierte Zelle nach Anspruch 27,
gekennzeichnet durch
10 *Saccharomyces cerevisiae*.
29. Transformierte Zelle nach Anspruch 28,
gekennzeichnet durch
Saccharomyces cerevisiae - Stamm 22574dpDRSuSy.
- 15 30. Verwendung einer, im Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17
erhältlichen Saccharose Synthase zur Synthese und / oder Spaltung von
Sacchariden und / oder Saccharidderivaten.

1/5

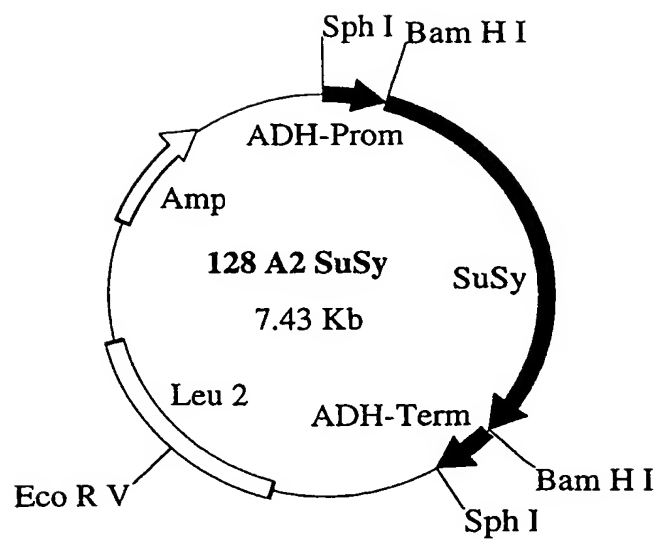


Fig. 1

2/5

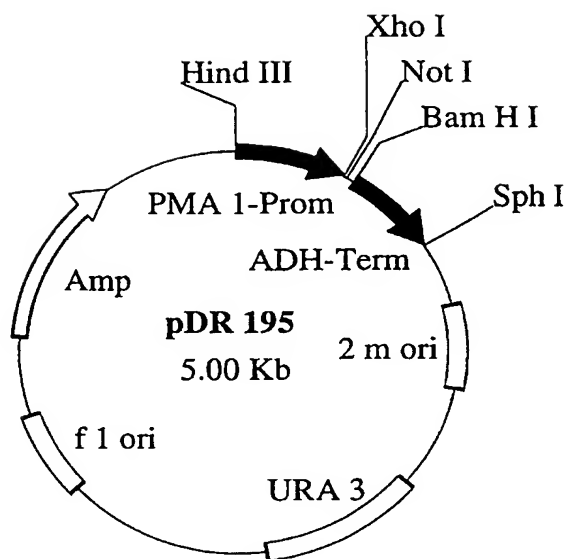


Fig. 2

3/5

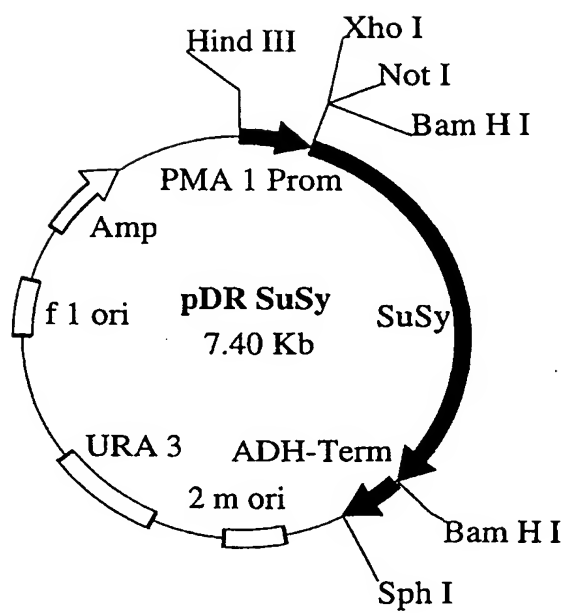


Fig. 3

4/5

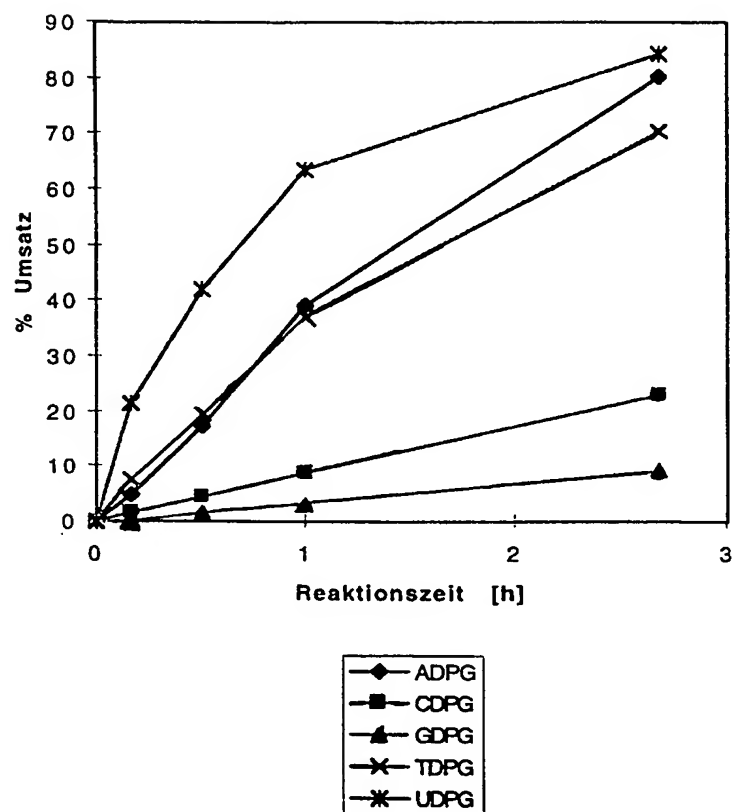


Fig. 4

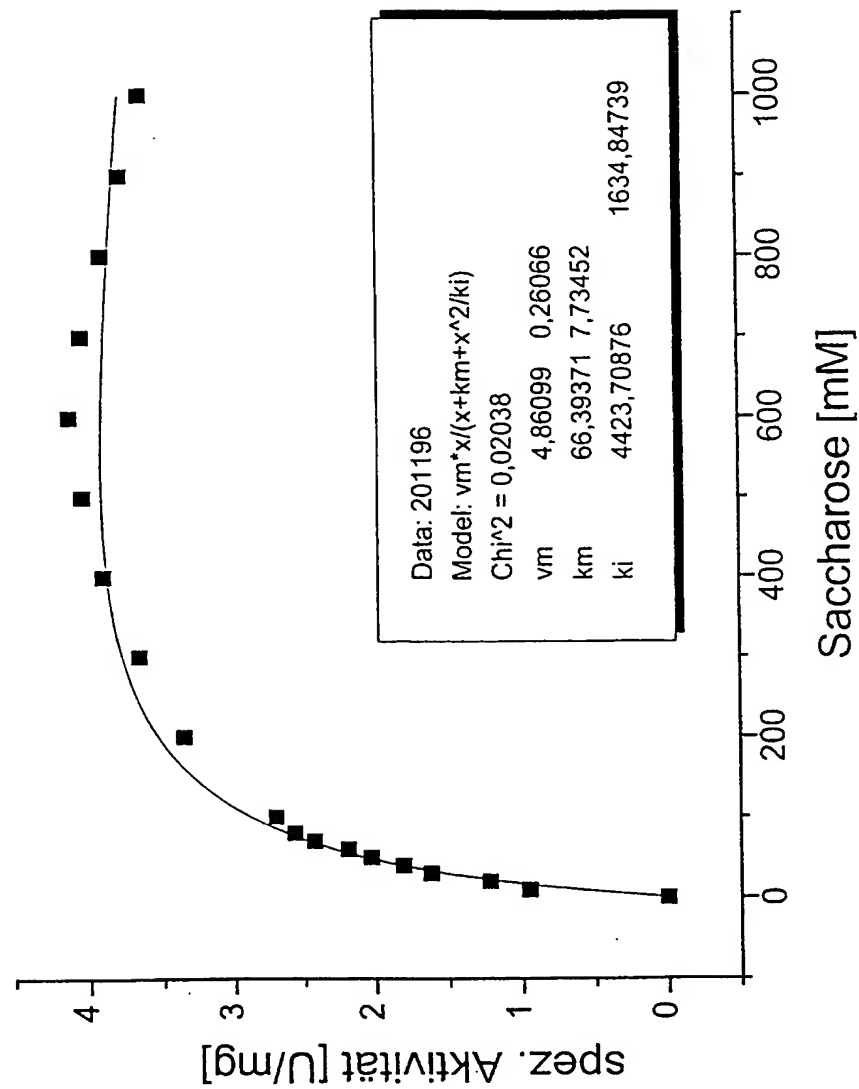


Fig. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/05309

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/81 C12N15/54 C12N9/10 C12P19/02 C12P19/12
C12P19/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 717 107 A (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA (JP); KONDO K.; KAJIWARA S.; MISAWA N.) 19 June 1996 see page 6, line 37-45 see page 13, line 22-42 see page 31, line 19 - page 32, line 42; examples 24,25 see page 61 - page 66; claims ---	1-30
Y	WO 94 00574 A (INSTITUT GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG BERLIN GMBH (DE); FROMMER; RIESMEIER) 6 January 1994 see page 22 - page 24; example 1 --- -/--	1-30

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 November 1998

Date of mailing of the international search report

14/12/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Macchia, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/05309

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 01540 A (FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICK GMBH (DE); ELLING LOTHAR; KULA MARIA REGINA) 20 January 1994	30
A	see abstract see page 4, paragraph 3 see page 6 - page 7; example 1 ---	13-17
A	MELLOR J. ET AL.: "Factors affecting heterologous gene expression in <i>saccharomyces cerevisiae</i> " GENE, vol. 33, 1985, pages 215-226, XP002086158 see page 215 - page 216, left-hand column, paragraph 1 ---	6,7
A	EP 0 284 044 A (ZYMOGENETICS INC. (US); IRANI M.H.; KILGORE T.L.) 28 September 1988 ---	6,7
A	JAUNIAUX J.-C. ET AL.: "Nitrogen catabolite regulation of proline permease in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Cloning of the PUT4 gene and study of PUT4 RNA levels in wild-type and mutant strains" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 164, no. 3, 1 May 1987, pages 601-606, XP002086140 cited in the application see page 602; table 1 -----	12,29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/05309

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0717107 A	19-06-1996	JP 8173170 A	09-07-1996
		AU 2537795 A	18-12-1995
		CA 2168037 A	30-11-1995
		FI 960331 A	20-03-1996
		WO 9532289 A	30-11-1996
		NO 960247 A	22-03-1996
WO 9400574 A	06-01-1994	DE 4220759 A	05-01-1994
		AU 671135 B	15-08-1996
		AU 4500393 A	24-01-1994
		CA 2137346 A	06-01-1994
		EP 0647273 A	12-04-1995
		HU 70472 A	30-10-1995
		JP 7509123 T	12-10-1995
		US 5608146 A	04-03-1997
WO 9401540 A	20-01-1994	DE 4221595 C	09-09-1993
		CA 2139419 A	20-01-1994
		EP 0650520 A	03-05-1995
		JP 2780062 B	23-07-1998
		JP 7508413 T	21-09-1995
		US 5750389 A	12-05-1998
EP 0284044 A	28-09-1988	CA 1304020 A	23-06-1992
		DE 3888561 D	28-04-1994
		DE 3888561 T	01-09-1994
		DK 159188 A	14-12-1988
		JP 1016587 A	20-01-1989
		JP 2795850 B	10-09-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05309

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/81 C12N15/54 C12N9/10 C12P19/02 C12P19/12
C12P19/28

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 717 107 A (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA (JP); KONDO K.; KAJIWARA S.; MISAWA N.) 19. Juni 1996 siehe Seite 6, Zeile 37-45 siehe Seite 13, Zeile 22-42 siehe Seite 31, Zeile 19 - Seite 32, Zeile 42; Beispiele 24,25 siehe Seite 61 - Seite 66; Ansprüche ---	1-30
Y	WO 94 00574 A (INSTITUT GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG BERLIN GMBH (DE); FROMMER; RIESMEIER) 6. Januar 1994 siehe Seite 22 - Seite 24; Beispiel 1 --- -/--	1-30

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. November 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

14/12/1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Macchia, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/05309

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie ²	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 94 01540 A (FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICK GMBH (DE); ELLING LOTHAR; KULA MARIA REGINA) 20. Januar 1994	30
A	siehe Zusammenfassung siehe Seite 4, Absatz 3 siehe Seite 6 - Seite 7; Beispiel 1 ----	13-17
A	MELLOR J. ET AL.: "Factors affecting heterologous gene expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " GENE, Bd. 33, 1985, Seiten 215-226, XP002086158 siehe Seite 215 - Seite 216, linke Spalte, Absatz 1 ----	6,7
A	EP 0 284 044 A (ZYMOGENETICS INC. (US); IRANI M.H.; KILGORE T.L.) 28. September 1988 ----	6,7
A	JAUNIAUX J.-C. ET AL.: "Nitrogen catabolite regulation of proline permease in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Cloning of the PUT4 gene and study of PUT4 RNA levels in wild-type and mutant strains" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 164, Nr. 3, 1. Mai 1987, Seiten 601-606, XP002086140 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 602; Tabelle 1 -----	12,29

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

ationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05309

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0717107 A	19-06-1996	JP 8173170 A	09-07-1996
		AU 2537795 A	18-12-1995
		CA 2168037 A	30-11-1995
		FI 960331 A	20-03-1996
		WO 9532289 A	30-11-1996
		NO 960247 A	22-03-1996
WO 9400574 A	06-01-1994	DE 4220759 A	05-01-1994
		AU 671135 B	15-08-1996
		AU 4500393 A	24-01-1994
		CA 2137346 A	06-01-1994
		EP 0647273 A	12-04-1995
		HU 70472 A	30-10-1995
		JP 7509123 T	12-10-1995
		US 5608146 A	04-03-1997
WO 9401540 A	20-01-1994	DE 4221595 C	09-09-1993
		CA 2139419 A	20-01-1994
		EP 0650520 A	03-05-1995
		JP 2780062 B	23-07-1998
		JP 7508413 T	21-09-1995
		US 5750389 A	12-05-1998
EP 0284044 A	28-09-1988	CA 1304020 A	23-06-1992
		DE 3888561 D	28-04-1994
		DE 3888561 T	01-09-1994
		DK 159188 A	14-12-1988
		JP 1016587 A	20-01-1989
		JP 2795850 B	10-09-1998